

PCT/JP 2004/014779  
30.09.2004

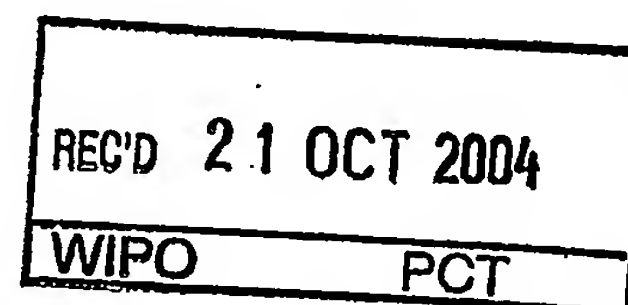
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 4 6 9 3 7  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 3 4 6 9 3 7 ]



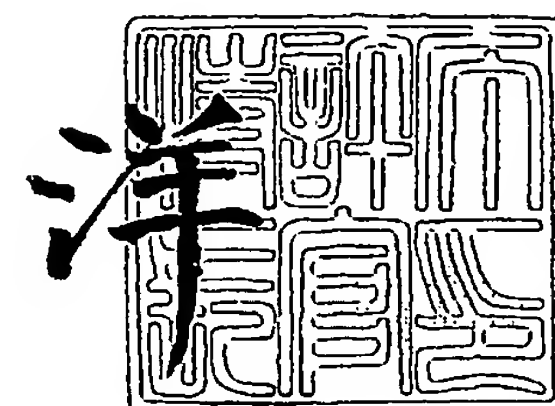
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社資生堂

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 0 8 9 4



【書類名】 特許願  
【整理番号】 1033903  
【提出日】 平成15年10月 6日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 A06K 67/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 岸本 治郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 江浜 律子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 出田 立郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 荒井 孝之  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001959  
    【氏名又は名称】 株式会社資生堂  
【代理人】  
    【識別番号】 100099759  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 青木 篤  
    【電話番号】 03-5470-1900  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100077517  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石田 敬  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087413  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 古賀 哲次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100117019  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 渡辺 陽一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082898  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 西山 雅也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 209382  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1



【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0305959



**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

毛乳頭細胞調製品を調製する方法であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛胞上皮細胞を死滅させることを特徴とする、方法。

**【請求項 2】**

前記細胞懸濁物の細胞密度を  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$  に調整してから凍結保存を行う、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

前記凍結保存を  $-80^\circ\text{C}$  以下の温度で行う、請求項 1 又は 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記凍結保存を液体窒素の中で行う、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 5】**

前記凍結保存を 1 週間以上の期間にわたって行う、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 6】**

皮膚組織がマウスに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 7】**

皮膚組織がラットに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 8】**

皮膚組織がヒトに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。



【書類名】明細書

【発明の名称】毛乳頭細胞調製品の調製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は活性毛乳頭細胞を含有し、且つ含有する上皮系細胞が不活化された毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

毛包は成熟した生体で自己再生をほぼ一生涯を通じて繰り返す例外的な器官である。その自己再生の仕組みを解明することは、組織や細胞移植による脱毛治療、毛包や皮脂腺を含有する自然に近い機能的にも優れた皮膚シートの構築など、ニーズの高い臨床応用に繋がるものと期待される。近年、幹細胞研究への関心の高まりと共に毛包上皮幹細胞（上皮細胞）の研究が急速に進展し、また毛包特異的な間葉系細胞たる毛乳頭細胞についてもその性質が少しずつ判ってきた。毛乳頭細胞は毛包の自己再生のために毛包上皮幹細胞に活性化シグナルを送るいわば司令塔の役割を担い、毛包再構成評価系においては毛包上皮幹細胞と共に欠くことのできない細胞であることが判っている（Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), Vol.96, pp. 7336-7341; 非特許文献1）。

【0003】

毛包の再生を目指して、動物モデルでの毛包再構成実験がこれまで様々な方法で行われている。Weinberg et al., J. Invest. Dermatol. (1993), Vol.100, pp. 229-236（非特許文献2）には細胞移植法による毛包再構成方法が記載されている。Weinbergらの移植系は毛乳頭細胞、新生児上皮系細胞（毛包上皮幹細胞を含む）のほかにマウス3T3細胞が加えられた複雑な構成を有する。Weinbergらによれば上皮系細胞画分を移植系に加えなくても毛包が再生するとのことである。しかしながら、これは毛乳頭細胞から未分化上皮系細胞（毛包上皮幹細胞）や毛包原基を完全に除去することが困難なために起きた現象であると考えられる。その後、Kishimotoら（前掲）は体毛毛乳頭細胞の単離精製にはじめて成功し、単離精製した毛乳頭細胞を用い、動物モデルでの細胞移植法による毛包再構成実験を行った結果、毛乳頭細胞と上皮細胞との組み合わせを含む細胞画分を移植すると毛包が再構成され、発毛が認められるが、毛乳頭細胞又は上皮細胞のいずれかしか含まない細胞画分を移植した場合、発毛が認められないことを見出している。

【0004】

しかしながら、Kishimotoらによる毛乳頭細胞の精製方法は、毛乳頭細胞がバーシカン（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン類）を特異的に発現する性質を有することを利用し、バーシカン遺伝子にリポーター遺伝子を繋げたDNAを用いて作製したトランスジェニックマウスモデルによってバーシカン発現を指標とし、単離・濃縮を行うものである。従って、この方法はトランスジェニックマウスの作製、セルソーターによる毛乳頭細胞の純化を要する。特に、毛包再構成方法において毛包を実際に再生させ、発毛を起こさせるには大量の毛乳頭細胞が必要であり（例えば、1移植当たり500万個の細胞）、そのためこの方法では大量のトランスジェニックマウスの作製、長時間の高速セルソーターの使用を要し、経済的にも、また作業時間、労力の面においても問題があった。毛乳頭細胞の単離は例えばProuty et al., American J. Pathol. (1996) Vol.148, No.6, pp.1871-1885（非特許文献3）にも記載されているが、遠心分離により分画を繰り返す複雑で、純度が低く且つ収量の低い方法である。

【非特許文献1】Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), pp. 7336-7341

【非特許文献2】Weinberg et al., J. Invest. Dermatol. (1993), Vol.100, pp. 229-236

【非特許文献3】Prouty et al., American J. Pathol. (1996) Vol.148, No.6, pp. 1871-1885

【発明の開示】



## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の課題は、トランスジェニックマウスを使用せず、簡単に、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者は、驚くべきことに、皮膚組織から採取した真皮組織画分の細胞懸濁物を凍結保存すると、その懸濁物中に夾雑した毛包上皮細胞が特異的に死滅し、毛乳頭細胞は大半が活性であり続けることを見出した。その結果、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する細胞調製品を得ることができた。

## 【0007】

従って、本発明は毛乳頭細胞調製品を調製する方法であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることを特徴とする方法を提供する。

## 【0008】

上記細胞懸濁物の細胞密度を  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$  に調整してから凍結保存を行うことが好ましい。更に好ましくは、上記凍結保存は  $-80^\circ\text{C}$  以下の温度で、例えば液体窒素の中で、好ましくは1週間以上の期間にわたって行う。

## 【0009】

好適な態様において、上記皮膚組織がマウス、ラット又はヒトに由来するものであってよい。

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明により、トランスジェニックマウスを使用せず、簡単に、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供することができる。この毛乳頭細胞調製品は毛包再生のための移植手術や、毛包再構成の研究・開発に利用できる。特に、当該毛乳頭細胞調製品には活性上皮幹細胞の夾雑がないため、毛包の再生に使用する活性毛乳頭細胞と活性上皮毛幹細胞の細胞数の割合を精密に調整することが必要であり、しかも細胞を大量に必要とする場合、有利である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0011】

本発明は毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供する。「毛乳頭細胞」とは、間葉系細胞として毛包最底部に位置し、毛包の自己再生のために毛包上皮幹細胞に活性化シグナルを送る、いわば司令塔の役割を担っている細胞をいう。本発明の方法は、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることを特徴とする。

## 【0012】

上記方法は、具体的には、例えば以下の通りにして実施できる。

1. 哺乳動物の表皮を用意する。
2. この表皮を、必要ならタンパク質分解酵素溶液、例えばトリプシン溶液の中に適当な時間、例えば一晩静置し、その後表皮部分をピンセットなどで取り除き、残った真皮をコラゲナーゼで処理し、細胞懸濁液を調製する。
3. 必要ならセルストレーナーにより懸濁液をろ過し、静置により沈殿物を除去する。
4. 細胞数を計測し、適当な細胞密度、好ましくは  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$  程度の細胞密度にて凍結保護液で再懸濁し、必要なら小分け分注し、通常の細胞保存方法に従い、凍結保存する。
5. 適当な期間保存後、融解し、使用する。

## 【0013】

本発明において使用する哺乳動物の表皮はあらゆる哺乳動物に由来してよく、限定する



ことなくマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒトであってよい。動物の系統も限定されることはない。

#### 【0014】

凍結方法は特に限定されることはないが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下、好ましくは $-50^{\circ}\text{C}$ 以下、より好ましくは $-80^{\circ}\text{C}$ 以下の超低温冷凍庫中で、又は液体窒素中で保存する。凍結保存期間も特に限定されることがないが、上皮細胞が死滅するよう、例えば1日以上、好ましくは3日以上、より好ましくは1週間以上の期間とする。尚、液体窒素中で4ヶ月保存しても、毛乳頭細胞は生存し続けていることが確認された。

凍結保護液としては細胞の保存において使用されている通常の保存液、例えばセルバンカー2細胞凍結保存液（カタログNo. BLC-2）〔日本全業工業製〕が使用できる。

#### 【0015】

本発明の方法により調製した毛乳頭細胞調製品は上皮系細胞との組み合わせにおいて、毛包の再生のための移植に使用することができる。組み合わせは同種系でも、異種系でもよい。例えば、毛乳頭細胞調製品がマウスに由来する場合、上皮系細胞はマウスに由来するか（同種）、又はその他の種、例えばラット、ヒトに由来してもよい（異種）。また、この組み合わせをレシピエント動物に移植する場合、その移植は同種移植、即ち自己移植、同種同系移植もしくは同種異系移植であっても、異種移植であってもよい。同種移植の場合、毛乳頭細胞調製品及び上皮系細胞は共にレシピエントと同種である。異種移植では、毛乳頭細胞調製品又は上皮系細胞のいずれか一方がレシピエントと異種であり、他方がレシピエントと同種である場合と、双方がレシピエントと異種の場合がある。レシピエント動物としてはあらゆる哺乳動物、例えばヒト、マウス、ラットが挙げられる。

#### 【0016】

「上皮系細胞」は、皮膚の表皮または上皮の大部分を構成する細胞であり、真皮に接する1層の基底細胞から生じる。マウスを例にすると、上皮系細胞としては新生仔（もしくは胎児）に由来する上皮系細胞が好ましく使用できるが、ケラチノサイトの形態にある細胞の培養物であってもよい。このような細胞は、当業者周知の方法により所望のドナー動物の皮膚から調製することができる。

#### 【0017】

好適な態様において、上皮系細胞は以下のとおりにして調製できる。

1. 哺乳動物の表皮を用意する。
2. この表皮を、必要なら0.25%トリプシン/PBS中で $4^{\circ}\text{C}$ 下で一晩静置することとトリプシン処理する。
3. ピンセットなどにより表皮部分のみ剥離し、細切後、適当な培養液（例えばケラチノサイト用培養液）中で $4^{\circ}\text{C}$ で約1時間懸濁処理する。
4. この懸濁物を適当なポアサイズを持つセルストレーナーを通し、次いで遠心分離器にかけて上皮系細胞を回収する。
5. この細胞調製品はKGMあるいはSFM培地に所望の細胞密度で懸濁し、使用直前まで氷上に静置しておく。

#### 【実施例】

#### 【0018】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実験1

真皮細胞画分の凍結保存により、上皮細胞が死滅し、活性細胞として毛乳頭細胞のみを含有する細胞調製品が得られることを確認するため、バーシカン（Versican）プロモーター下流にマーカータンパク、LacZ、の構造遺伝子をつないだ発現ベクターを導入したトランスジェニックマウス（以下「バーシカン-LacZ TGマウス」）より採取した皮膚組織より得られた細胞画分を凍結保存し、融解した細胞調製品についてフローサイトメトリー解析した。

#### 【0019】

- (1) バーシカン-LacZ TGマウスの真皮細胞からの「凍結保存」毛乳頭細胞調製品の調



製

(1-1) バーシカン-LacZ TGマウスから生まれた新生仔(生後4日以内に使用)のうち、LacZ陽性の個体を選別した。バーシカン-LacZ TGマウスは、例えばKishimotoら(前掲)に記載の方法により作製することができる。

(1-2) 各個体をエタノールとリン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」)で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置した。

(1-3) 翌日、ピンセットなどにより表皮と真皮を分離し、真皮側を0.35%コラゲナーゼ/DMEM(ダルベッコ変法イーグル最少培地。以下「DMEM」)により37℃下で約1時間ほど処理した。

(1-4) (1-3)の細胞を念入りに懸濁操作を行ったのち、70μメートルのポアサイズを持つセルストレーナーに通し、次いで遠心分離器(900g、10分)によって細胞を集めた。

(1-5) 細胞数を計測し、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ /mlの細胞密度にて凍結保護液で再懸濁し、凍結チューブに分注、通常の細胞保存方法に従い、液体窒素内で保存した。

(1-6) 約1週間後に融解し、これを以下のフローサイトメトリー解析に用いた。

#### 【0020】

(2) フルオロレポーター LacZフローサイトメトリー解析

実験材料

・フルオロレポーター LacZフローサイトメトリーキット(FluoroReporter lacZ flow cytometry kits) Molecular Probe社、カタログNo. F-1930(50反応分)/F-1931(250反応分)

・試薬の準備:

反応液: キット中のFDG試薬(Component A)をMiliQ水で1:10に希釈した。1サンプル当たり50μLを使用した。

停止液: キット中のPI試薬(Component D)をキット付属の緩衝液で1:100に希釈した。1サンプル当たり0.9mlを使用した。使用するまで氷中において4℃に冷やしておいた。染色媒体としては、上皮細胞を特異的に染色する特異的抗体であるCD49fモノクローナル抗体(セロテック社製、MCA699)、死細胞を特異的に染色する7-ADD(ベックマンコールター、PN-1M3422)を用いた。

#### 【0021】

(2-1) バーシカン-LacZ TGマウス由来の真皮細胞の懸濁液を $\sim 1 \times 10^7$ 細胞数までの細胞数に調整して、750ulの染色媒体を加えて、1.5mlのエッペンチューブに移した。

(2-2) 3000回転で5分間遠心し、上澄みを捨てた。細胞ペレットを100μLの染色媒体に再懸濁した。この懸濁物を37℃の恒温槽で10分間プレインキュベーションした。

(2-3) 37℃の恒温槽で10分間プレインキュベーションしておいた反応液を50μL加えて、正確に1分間、37℃で反応を行った。

(2-4) 0.9mlの停止液を加え、氷中に保存した。

(2-5) 10分後に40μLの50mM PETG(正式名)(Component B)を加えて反応を完全に阻害した。

(2-6) すみやかにFACSで蛍光強度を測定した。フローサイトメーター(FACS)の操作方法是メーカーの取扱説明書によった。FACSの測定装置は例えば、ベックマン・コールター社のXL-MCLを用いることができる。本キットに使用されている蛍光色素Fluorescein(フルオロセイン)に適した検出設定で細胞の蛍光強度の分布を測定した。

#### 【0022】

(3) 解析結果

Lac及び7-AADに基づくFACS解析は、凍結融解した細胞中のLacZ<sup>+</sup>細胞の大半が、凍結融解を経ても生細胞であることを示した(図1)。従って、毛乳頭細胞は凍結融解によって死滅しないことが明らかとなった。また、CD-49及び7-AADに基づくFACS解析では、CD-4



9<sup>+</sup>細胞（上皮系細胞）の大半が凍結融解後、7-AAD<sup>+</sup>画分（死画分）に存在することが示された（図2）。従って、凍結融解した細胞調製品中の生細胞はLacZ<sup>+</sup>、CD-49<sup>-</sup>、7-AAD<sup>-</sup>、即ち、毛乳頭細胞（LacZ<sup>+</sup>）且つ非上皮系細胞（CD-49<sup>-</sup>）であり、しかも生細胞（7-AAD<sup>-</sup>）である。以上の結果をまとめると、生細胞は大半が上皮系細胞ではなく、毛乳頭細胞であることが明らかとなった。よって、凍結融解により上皮系細胞を特異的に死滅させることができ、活性細胞として毛乳頭細胞のみ含む毛乳頭細胞調製品を調製できることが明らかとなった。

#### 【0023】

##### 実験2

凍結融解毛乳頭細胞と上皮系細胞の混合移植により毛包再生を試みた。

##### I. 各種細胞の調製

##### (1) マウス由来上皮細胞

(1-1) 手術前日、ICR系統マウスの新生仔より各個体をエタノールとリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」）で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置することで皮膚をトリプシン処理した。

(1-2) ピンセットなどにより表皮部分のみ剥離し、細切後、ケラチノサイト用培養液（以下「KGM」）中で4℃で約1時間懸濁処理した。

(1-3) セルストレーナーを通した(1-2)の懸濁物を遠心分離器（×900g、10分）にかけて上皮系細胞を回収した。

(1-4) レシピエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の上皮系細胞（細胞数として約 $1 \times 10^7$ ）を手術に用いた。相当量の細胞をKGMあるいはSFM培地で懸濁して、使用直前まで氷上に静置した。これを「マウス由来上皮細胞」調製品とする。

#### 【0024】

##### (2) 「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品（比較例）の調製

(2-1) 手術前日、ICR系統マウスの新生仔より上記(1-1)、(1-2)と同様の方法により皮膚をトリプシン処理した。

(2-2) ピンセットにより表皮部分を剥離し、残った真皮を細切後、0.35%のコラゲナーゼを含んだ適当な培養液DMEM+10%FBS中で37℃で約1時間懸濁処理した。

(2-3) セルストレーナーを通した懸濁物(2-2)を遠心分離器にかけて真皮細胞を回収した。

(2-4) レシピエント動物1個体あたり、細胞数として約 $1 \times 10^7$ の真皮細胞を手術に用いた。相当量の細胞をDMEM+10%FBSなどで懸濁して、使用直前まで氷上に静置した。これを「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品とする。

#### 【0025】

##### (3) 毛乳頭細胞画分を含む「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品の調製

(3-1) 新生仔ICR系統マウス背部皮膚を剥離し、表皮を採取した。

(3-2) トリプシン溶液で一晩静置し、翌日表皮をピンセットで取り除き、残った真皮をコラゲナーゼで処理、細胞懸濁液を調製した。

(3-3) セルストレーナーにより上記懸濁物をろ過し、そして静置により沈殿物を除去した。

(3-4) 細胞数を計測し、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8/\text{ml}$ の細胞密度に凍結保護液で再懸濁し、凍結チューブに分注、通常の細胞保存方法に従い、液体窒素内で保存した。

(3-5) 約1週間後に融解し、移植実験に $1 \times 10^7$ 個/移植を用いた。これを「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品とする。

#### 【0026】

##### II. 毛包再構成方法（動物への移植方法）

上記マウス由来上皮細胞調製品(1-4)を「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品(2-4)又は「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品(3-5)と混合した。これらの混



合物を以下の「再構成毛包作成手順」の「細胞懸濁液」として用いた。

【0027】

＜再構成毛包作成手順＞

用意するもの：

レシピエント動物（B a l b - c n u / n n 系統ヌードマウス。5 週齢以上）、  
シリコン製の直径1センチ程度のドーム状キャップ（以下バルブと呼称）、

麻酔薬、

手術用ハサミ、ピンセット、縫合器、

マイクロピペッター

細胞懸濁液（培養液DMEM+10%FBS約150 $\mu$ lに懸濁）

【0028】

＜手順＞

(i) ヌードマウスを麻酔した。

(i i) 背部皮膚を直径1センチ弱に切り取った。

(i i i) 傷口にバルブを挿入し、縫合器で固定した。

(i v) バルブ内に、細胞懸濁液をピペッターを用いて注入した。

(v) そのまま約1週間飼育し、バルブをはずした。

(v i) バルブをはずした後、1～6週間後（通常は2週間後）、かさぶたが取れた跡に、再構成毛包の生育を観察した。

【0029】

毛包再構成実験の結果を以下の表及び図3に示す。「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品のみを移植した場合でも毛包再生が認められるのに対し、「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品のみを移植した場合には毛包再生は認められなかった。この結果は、Kishimotoら（前掲）のトランスジェニックマウス由来の真皮細胞画分からセルソーターにより純化した毛乳頭細胞を用いて得られた結果と一致し、「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品には活性細胞成分として毛乳頭細胞のみが含まれていることを実証した。

【表1】

表1 移植実験結果

真皮画分	上皮系画分	毛包再生	(発毛数/移植数)
用時調製（未凍結）	用時調製	++	(4/4)
用時調製（未凍結）	—	++	(4/4)
凍結融解	用時調製	++	(10/10)
凍結融解	—	—	(0/10)
—	用時調製	—	(0/10)

【産業上の利用可能性】

【0030】

本発明により調製された毛乳頭調製品は毛包再構成についての研究・開発に利用されるの再生のための移植に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】 Lac及び7-AADに基づくFACS解析結果。

【図2】 CD-49及び7-AADに基づくFACS解析結果。

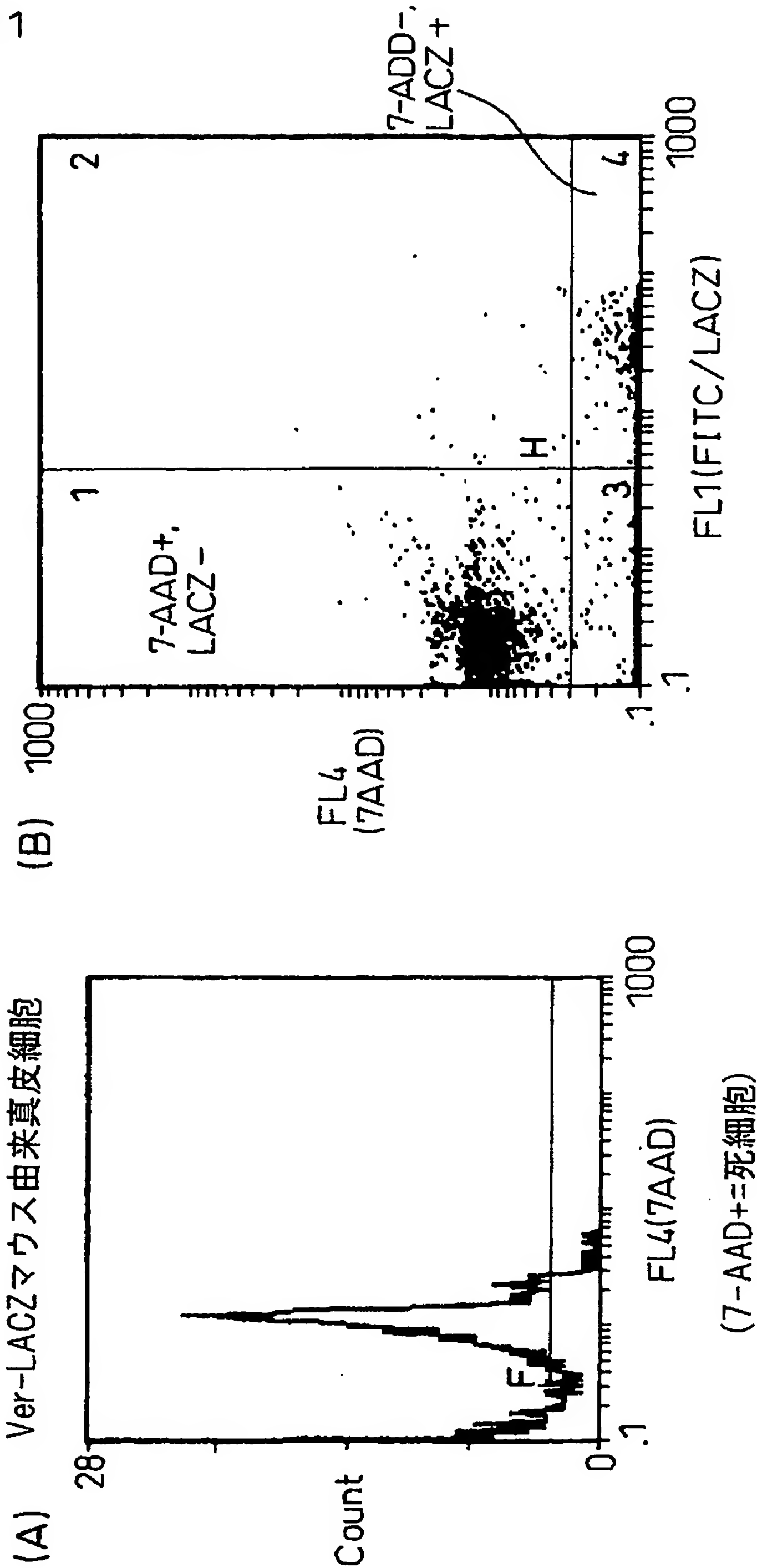
【図3】 凍結融解毛乳頭細胞と上皮系細胞の混合移植による毛包再生結果。



【書類名】 図面  
【図 1】

図 1

凍結融解真皮細胞画分のFACS解析(1)



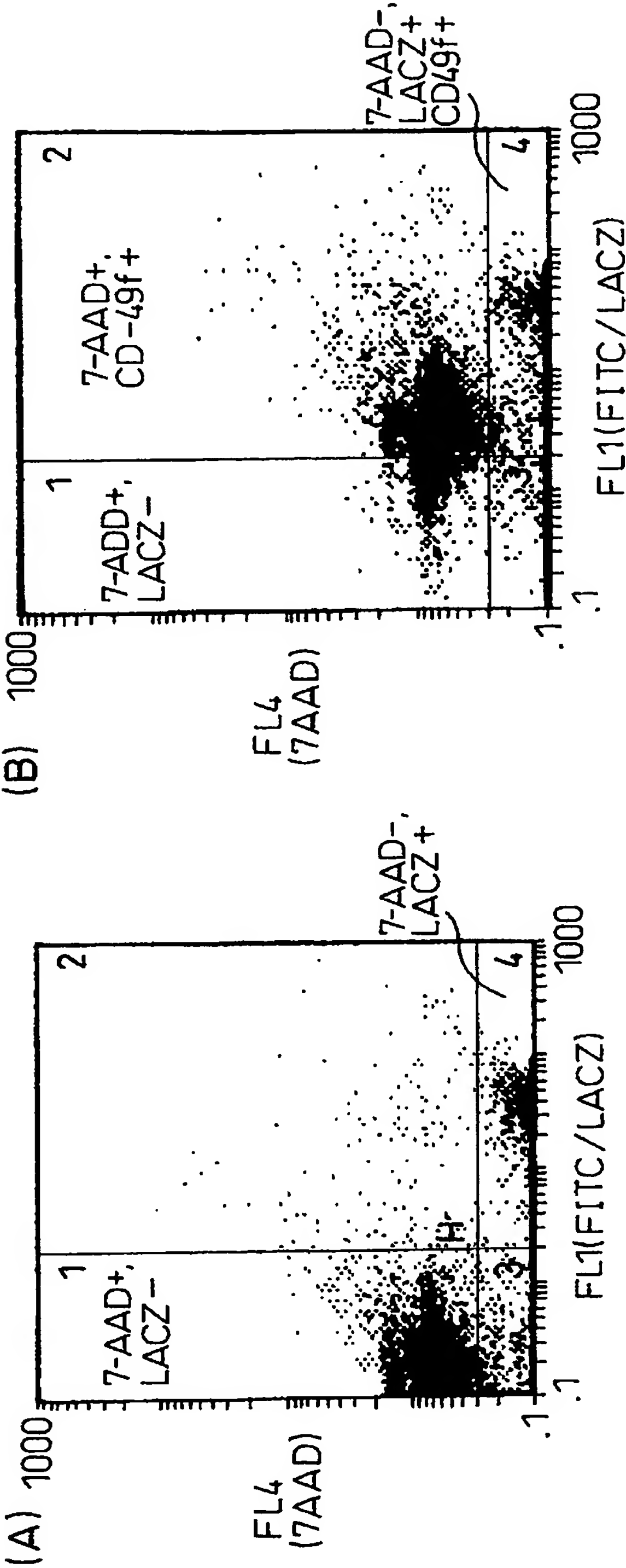
(A)			(B)		
Hist	Region	ID	Hist	Region	ID
3	D	LACZ+	7	H1	FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-)
5	F	7AAD+		H2	FL1-FL4
				H3	FL1-FL4
				H4	FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)
					%
					33.6
					0.92
					31.6
					33.9



【図 2】

図 2

凍結融解真皮細胞画分のFACS解析(2)



(A) 7AAD標識	
Region ID	%
D LACZ+	37.5
F 7AAD+	39.5
H1 FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-)	37.3
H2 FL1-FL4	2.40
H3 FL1-FL4	25.1
H4 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)	35.2

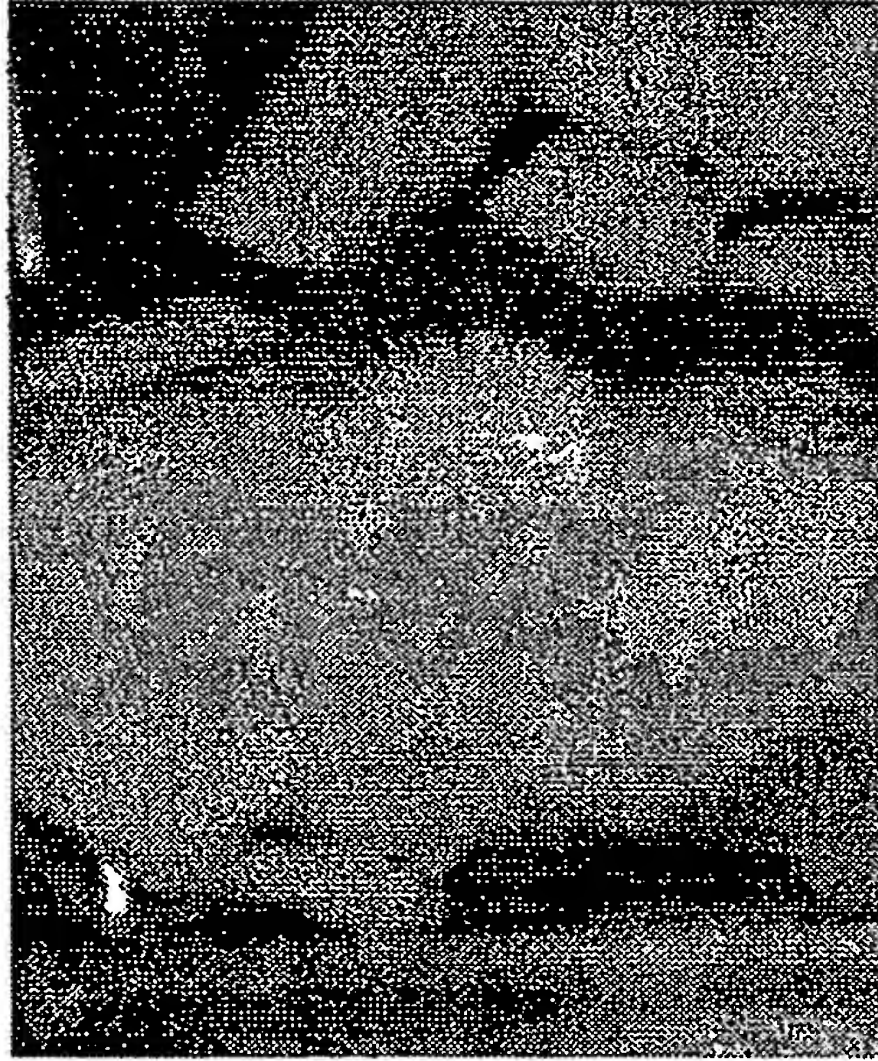
  

(B) 7AAD標識+CD49f-FITC標識	
Region ID	%
D LACZ+/CD49f	74.2
F 7AAD+	43.5
H1 FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-,CD49f-)	10.6
H2 FL1-FL4(7-AAD+,CD49f+)	33.0
H3 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ-,CD49f-)	14.5
H4 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)	41.9



【図 3】

図 3



上皮系細胞＋凍結毛乳頭細胞

移植4週間後



上皮系細胞のみ



凍結毛乳頭細胞のみ



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、トランスジェニックマウスを使用せず、簡単に、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供することにある。

【解決手段】 本発明は毛乳頭細胞調製品を調製する方法であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛胞上皮細胞を死滅させることを特徴とする方法を提供する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 3 - 3 4 6 9 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 5 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号

氏 名

株式会社資生堂



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**